

(19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 31/426

(45) 공고일자 2004년11월03일
(11) 등록번호 10-0454767
(24) 등록일자 2004년10월20일

(21) 출원번호 10-2001-0043490
(22) 출원일자 2001년07월19일

(65) 공개번호 10-2003-0008654
(43) 공개일자 2003년01월29일

(73) 특허권자

동화약품공업주식회사
서울 중구 순화동 5번지

서홍석
부산광역시 금정구 부곡동 244-7 부곡대우아파트 112-502

(72) 발명자

이진수
경기도용인시수지읍풍덕천693삼성1차아파트105-1306

김판수
경기도안양시동안구비산동관악성원아파트303동1007호

황연하
경기도안산시월파동447번지한양아파트4동102호

유제만
경기도안양시동안구부흥동1103은하수아파트207-101

정용호
경기도안양시동안구호계동샘마을아파트301-204

서홍석
부산광역시 금정구 부곡동 244-7 부곡대우아파트 112-502

김은주
대전광역시유성구신성동한울아파트106동1002호

김도희
경기도성남시수정구단대동93-11

박용업
부산광역시금정구부곡1동313-31

(74) 대리인

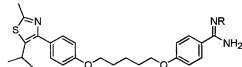
이병현

심사관 : 한정희

(54) 4-[(4-티아졸릴)페녹시]알콕시-벤즈아미딘 유도체의골다공증 예방 및 치료제로서의 용도

본 발명은 류코트리엔-B₄ (Leukotriene-B₄; 이하 LTB-4 로 약칭한다)의 수용체 길항작용을 갖는 것으로 알려진 하기 화학식 1로 표시되는 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘의 골다공증 예방 및 치료제로서의 용도에 관한 것이다.

[화학식 1]



상기 식에서 R은 H 또는 OH이다.

색인어

골다공증, 골 흡수, 류코트리엔-B₄, 파골세포

명세서

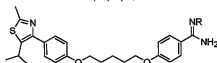
발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 4-{[(4-티아졸릴)-페녹시]알콕시}-벤즈아미딘 유도체를 함유한 골다공증 예방 및 치료용 약제 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 류코트리엔-B₄ (Leukotriene-B₄; 이하 LTB-4 로 약칭한다)의 수용체 길항작용을 갖는 것으로 알려진 하기 화학식 1로 표시되는 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘(이하 DW1352 라 한다) 또는 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘(이하 DW1350 이라 한다)의 골다공증의 예방 및 치료제로서의 용도에 관한 것이다.

화학식 1



상기 식에서 R은 H 또는 OH이다.

골(骨)은 신체의 물리적 지지체로서 필요한 골량과 구조를 보존하는 역할을 하며, 칼슘(Ca²⁺) 등의 보관고로서 칼슘 등의 혈중 농도 유지에 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 기능을 수행하기 위한 필요한 대응으로서 골은 항상 분해 작용과 재구축(remodelling)을 조정하여 이행한다. 따라서 골은 골 흡수와 골 형성의 양자가 활발하게 진행되어, 대사적인 면에서 극에 이르는 동적인 상태이다. 이 골 흡수와 골 형성간의 평형 관계가 파괴되면 골 흡수가 골 형성에 상대적으로 상회하게 되어 골밀도 또는 골량의 감소를 야기시켜 골강도가 유지되지 못하는 상태인 골다공증이 나타날 수 있는데, 이는 중-노년층의 여성에게 특히 많이 나타나는 질환이다.

파골세포의 기능을 저해하여 과다한 골 흡수를 억제함으로써 골다공증에 효과가 있는 치료제가 개발되어 왔으나 그동안 LTB-4의 수용체 길항작용을 갖는 것으로 알려진 물질들은 골 흡수의 억제효과가 미흡하여 골다공증치료제로서 개발되지 못하였다. 따라서 골 흡수를 효과적으로 억제하는 약제의 개발이 필요하다.

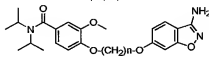
한편 4-{[(4-티아졸릴)-페녹시]알콕시}-벤즈아미딘 유도체는 류코트리엔-B₄ (Leukotriene-B₄; 이하 LTB-4 로 약칭한다)의 수용체 길항작용을 갖는 것으로 이미 공지된 물질이며 그의 제조방법도 함께 공지되어 있다(이성은, *Synthetic LTB₄ Related Disease*, 부산대학교 대학원 의학박사 학위논문, 1999. 8)

천연물인 LTB-4는 5-리폭시게네이스 경로에 의해 형성되는 아라키도네이트의 대사 물질 중의 하나인데 [Ford-Hutchinson, A.W. et al., *Nature* (London), 286, 264-265, 1980], 최근에는 아라키도네이트의 대사산물들이 골조직 대사에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되어 왔다. 조골세포에서 5-리폭시게네이스 대사산물이 생성되며, 이들에 의해 골흡수가 촉진되며(Meghji, S. et al., *Calcif. Tiss. Int.* 36, 139-149, 1988), 거대세포종(giant cell tumor)에서 얻어진 간질세포인 C433세포가 5-리폭시게네이스 대사산물들을 생성하여 파골세포수를 증가시키고 활동을 촉진시

키머(Mundy, G. R., *J. Bio. Chem.* 268, 10087-10094, 1993), 골조직 배양시 synthetic LTB-4를 첨가하면 골흡수가 촉진되고(Bonewald, L.F., *J. Bone Miner. Res.* 11, 521-529, 1996), LTB-4도 *in vitro*, *in vivo* 모두에서 파골세포 생성을 통하여 골 흡수를 일으킨다(Bonewald, L.F., *J. Bone Miner. Res.* 11, 1619-1627, 1996)고 각기 보고된 바 있다. 따라서 LTB-4 수용체에 대하여 길항작용을 나타내는 화합물은 골 조직 대사질환에 영향을 줄 것으로 보고 현재 이들에 대한 다각적인 연구가 진행 중에 있다.

이에, 본 발명자들은 다양한 구조의 화합물들을 합성하여 LTB-4 수용체에 대하여 길항제로서의 효능 또는 골 흡수 억제 및 골 형성 촉진 효과를 확인하는 작업을 해왔으며, 이들 중에서 아래 화학식 2의 3-아미노-1,2-벤조이소옥사졸 유도체가 LTB-4 수용체에 대하여 길항작용을 나타낼과 동시에 골다공증의 예방 및 치료에 효과가 있음을 확인하여, 이들에 대하여는 1998년 2월 4일자 출원 제 98-003138호로 특허출원을 한 바 있다.

화학식 2



상기 식에서 n은 3-5의 정수이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

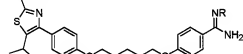
본 발명자들은 계속하여 골다공증에 대한 효과적인 치료를 목적으로, LTB-4 수용체의 길항작용을 갖는 4-[(4-티아졸릴)페녹시]알콕시-벤즈아미딘 유도체에 대하여 골 흡수 억제 효과를 확인하는 작업을 해왔으며, 이들 중에서 화학식 1로 표시되는 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 화합물이 파골세포의 기능을 효과적으로 억제하여 골 흡수 억제에 탁월한 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 화학식 1로 표시되는 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 그의 염을 유효양으로 함유하는 골다공증 치료제를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 화학식 1로 표시되는 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘의 골다공증 예방 및 치료제로서의 용도에 관한 것이다.

[화학식 1]



상기 식에서 R은 H 또는 OH이다.

4-[(4-티아졸릴)-페녹시]알콕시-벤즈아미딘 유도체는 공지된 방법(이성은, *Synthesis and Biological Activity of Natural Products and Designed New Hybrid Compounds for the Treatment of LTB₄ Related Disease*, 부산대학교 대학원 이학박사 학위논문, 1999. 8)에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명의 상기 화학식 1 화합물은 약제학적으로 허용되는 염으로 사용될 수도 있는데 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등이, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플루오로아세트산, 메탄설폰산, 말레인산벤조산, 글루콘산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엘본산, 글루탐산 또는 아스파르트산등이 사용될 수 있으며, 바람직하기로는 무기산으로는 염산이 유기산으로는 메탄설폰산이 사용될 수 있다.

본 발명의 골다공증 치료제는 각종의 투여 경로를 통하여 골다공증을 치료하는데 유효한 양으로 투여될 수 있으며, 그의 제형, 투여량 등은 부어복적, 투여경로 및 투여대상의 상태 및 제종 등을 고려하여 당업자가 용이하게 결정할 수 있다.

본 발명의 골다공증 치료제 조성물은 화학식 1로 표시되는 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘과 약제학적으로 허용되는 담체를 함유한다. 약제학적으로 허용되는 담체에는 멸균용액, 정제, 코팅제 및 캡슐과 같은 공지된 제형들에 사용되는 표준의 제약학적 담체 중 어느 것이든 포함된다. 전형적으로 이러한 담체는 전분, 밀크, 당, 특정 종류의 클레이, 젤라틴, 스테아린산, 탈크, 식물성 기름 또는 오일, 건, 글리콜류 등의 부형제, 또는 기타 다른 공지된 부형제를 포함한다. 이러한 담체에는 또한 풍미제, 색소 첨가제 및 다른 성분들이 포함될 수 있다. 이러한 담체를 함유하는 조성물은 주지된 방법에 의해 제형화 할 수 있다.

본 발명에 있어서 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘을 함유하거나 각기 그의 염을

함유하는 골다공증 치료제는 공지된 방법, 예를 들면 경구, 정맥내, 근육내, 경피투여 등의 방법에 의해 투여할 수 있지만, 이들 방법에만 한정되는 것은 아니다.

골다공증의 예방 및 치료효과를 기대하기 위한 4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시]-벤즈아미딘 또는 N-히드록시-4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시]-벤즈아미딘의 투여량은 매우 광범위하다. 골다공증 치료제로서의 유효한 양은 1일에 10~1000mg이다. 투여량 및 투여횟수는 제제의 특성, 투여대상의 체중 및 상태, 염증의 크기, 투여경로에 따라 당업자가 용이하게 결정할 수 있다.

다음의 실시 예는 본 발명을 더욱 자세히 설명하여 준다.

[실시 예 1] 파골세포의 분화억제 효과

각 실험물질이 파골세포의 형성과 분화과정에 미치는 영향을 조골세포와의 공존배양을 통해 평가하였다.

1. 세포의 준비

가. 골수세포의 준비

6-8주령 된 수컷 ddY 마우스로부터 무균적으로 경골을 적출하고 적출한 경골로부터 주사기(21G, 녹십자)를 이용하여 골수세포를 회수하여 α -MEM 배지(Gibco BRL사, 탄산소수나트륨 2.0g/L, 스트렙토마이신 100mg/L, 페니실린 100,000unit/mL을 첨가한 후 여과 멸균함) 5mL에 골수세포를 현탁하여 약 800 x g에서 5분간 원심분리하여 수거하였다. 골수세포의 적혈구를 제거하기 위해 Tris HCl(0.83% NH₄ Cl, pH7.4) 3mL를 첨가하여 잘 흔든 후, 원심분리를 통해 회수한 골수세포의 유핵 세포수를 확인하고, 공존배양을 위해 바로 사용하였다.

나. 골아세포의 준비

1-2일령 된 신생 ICR 마우스로부터 전구골과 두정골을 무균적으로 적출하여 PBS 용액으로 씻어 준 후, 혼합효소용액(0.2% 콜라게네이즈와 0.1% 디스파제)에 연속적으로 6-7회(10, 10, 10, 20, 20, 20분) 처리하고 조골세포의 특성을 지닌 세포들이 많이 존재하는 3-6회군의 세포를 집중적으로 수집하여 배양액(serum free α -MEM)으로 세척하였다. 세척된 세포들을 10% FBS가 포함된 α -MEM에서 2-3일 정도 배양한 후 1차 계대 배양하여 모은 세포들을 실험에 사용하였고, 회수한 세포들을 1×10^6 cell/mL의 농도가 되도록 희석하여 -70°C에서 보관하였다.

2. 파골세포의 분화정도의 측정

가. 시료의 준비

본 발명의 N-히드록시-4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시]-벤즈아미딘(DW1350) 또는 4-[5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시]-벤즈아미딘(DW1352)과 대조군으로 사용되는 LTB-4 수용체 길항제인 N,N-디이소프로필-4-[4-(3-아미노벤조[d]이소사자롤-6-일옥시)부톡시]-3-메톡시벤조아미드(이하 HS-1141 이라 한다) 및 4-[5-[4-(아미노이비도메틸)페녹시]펜톡시]-3-메톡시-N,N-비스(1-메틸에틸)벤즈아미드 탈렌산산(Morrissey M., Suh, H. 미국특허 제 5,451,700호, 이하 CGS-25019C라 한다)은 모두 멸균증류수에 용해하여 각 원하는 농도로 희석하였고, 세포배양액에 들어가는 최종 시료의 부피는 1:1000으로 하였다.

나. 공존배양을 통한 시료와의 반응

파골세포의 분화를 위해 상기 1번 항에서 준비한 골수세포와 골아세포를 공존배양하였다. 10% FBS가 포함된 α -MEM 배지를 사용하여 96 well plate에 골수세포(25,000 cells/cm²)와 골아세포(10,000 cells/cm²)를 분주하여 넣은 후, 실험하고자 하는 시료들을 넣어 7일간 배양하였다. 배양 동안 매스타틴 D3(10⁻⁶ M)과 비타민 D3(10⁻⁸ M)과 같은 분화인자를 배양 첫날부터 복합 투여하였으며, 2-3일간마다 상기 시료와 분화인자가 혼합된 새로운 배지로 교환하였다.

다. 파골세포의 분화정도의 평가

1) TRAP(Tartaric Acid Resistance Alkaline Phosphatase)염색액의 조제

TRAP 염색액에 양성반응을 가진 파골세포의 특성을 이용하여 성숙한 파골세포를 측정하는 마커(marker)로서 TRAP을 이용하였다. TRAP염색액의 조제는 기전 Naphtol AS-MS 포스페이트(sigma N-4875) 5mg 및 색소(Fast Red Violet LB salt) 25mg을 N,N-디메틸포름아마이드(약 0.5mL)에 녹였다. 50mM 타르타르산을 포함한 0.1N NaHCO₃ 완충액 50mL를 첨가한 후 냉장보관하며 염색액으로 이용하였다.

2) 염색법

7일간 배양한 세포로부터 배양액을 제거하고 PBS로 1회 세척한 후 10% 포름알데히드를 포함한 PBS에 세포를 2-5분간 고정하였다. 에탄올과 아세톤의 혼합액(1/1)에 약 1분간 세척 고정한 후 건조하였다. TRAP 염색액을 15분간 처리 후 수세건조하고 현미경하에서 염색 여부를 판단하여 그 결과를 판정하였다.

3) 결과의 판정

현미경하에서 TRAP-양성반응을 보이며 3개 이상의 핵을 가진 파골세포만을 관찰하여 그 수를 세었으며 각 실험군에 대해 3회 이상의 반복시험을 실시하였다.

결과는 대조군에 대한 각 실험군의 성숙파골세포 분화억제정도를 %값으로 표시하였으며, 50% 파골세포분화억제를 보이는 농도를 IC₅₀으로 산정하여 하기 표 1에 나타내었다. 종래의 LTB-4 수용체에 대한 길항작용을 가진 공지의 CGS-25019C와 같은 용도의 약물로서 본 발명자들에 의해 골다공증치료제로 공지된 HS-1141(미국 특허등록 제6150390호, 한국 특허출원 제98-3138호)을 대조군으로 사용하여 약효를 비교 및 평가하였다.

[표 1]

시료	% 저해정도				
	3.2nM	16nM	80nM	400nM	IC ₅₀

DW1350	1.0	68.8	82.3	88.0	19.87nM
DW1352	50.0	81.8	83.9	92.7	1.25nM
HS-1141	1.2	3.0	12.0	23.5	-
CGS-25019C	-8.9	8.3	0.0	17.7	-

상기 표 1에 나타난 결과와 같이 본 발명의 DW1350과 DW1352는 HS-1141 및 CGS-25019C에 비해 파골세포의 분화 및 형성과정에 대한 탁월한 억제능력을 가지고 있음을 알 수 있다. 매우 낮은 농도에서도 성숙한 파골세포로의 분화과정에 영향을 미치는 본 약물들의 특성은 골다공증 치료 및 예방을 위해 유리한 조건을 가지고 있는 것으로 평가된다.

[실시 예 2] Fusion assay

아직 성숙하지 않은 미융합 파골세포(prefusion osteoclasts(pOC), 한개 또는 두개의 핵을 가진 파골세포로 구성)들이 각 세포간의 융합을 통해 성숙한 파골세포(multinucleated osteoclast(OC))로 전환하여 분화하는 과정 중, 각 실험물질들이 미치는 영향을 파골세포의 융합정도로 평가하는 분석법이다.(Gregg Wesolowski et al. Experimental Cell Research 219, 679-686, 1995)

1. 미융합 파골세포(pOC)의 준비

미융합 파골세포는 상기 실시 예 1에서 준비한 골수세포와 골아세포와의 공존배양을 통해 얻을 수 있다. 100mm 배양집시에 골아세포(약 5×10^5 cell/plate)와 골수세포(약 1×10^7 cells/plate)를 혼합하여 접종하였다. 맥사메타손(10^{-6} M)과 비타민 D3(10^{-9} M)의 분화인자를 배양 첫날부터 복합 투여하였으며, 2일간 마다 분화인자가 포함된 새로운 배지로 교환하였다. 약 1개 또는 2개 정도의 파골세포가 융합된 상태인 미융합 파골세포는 공존배양 4일 정도에서 많이 형성되므로 4일째에 세포를 분리하여 이용하였다. 배양액을 제거하고 0.2% 플라게니즈 용액을 4mL 첨가한 후, 37°C에서 20분간 배양하여 부속세포를 분리하였다. 이때 분리된 대부분의 세포들은 조골세포로서 PBS 용액으로 2-3차례 씻어 남아있는 조골세포를 모두 제거하였다. 에치스타틴(echistatin containing 10% BSA)을 넣어 20분간 반응시키면 남아있는 대부분의 미융합 파골세포들이 분리되므로 이들을 모아 원심분리에 의해 세포를 회수하였다.

2. 융합실험의 반응

각 농도별로 희석한 실험물질을 α -MEM 배지(10% FBS 첨가)에 원하는 농도로 희석하여 잘 섞은 후, 96 well microplate에 100uL/well로 첨가하였다. 상기 1번 항에서 분리한 파골세포형 단핵세포를 5×10^3 cell/100uL/well로 첨가하고, 24시간 동안 37°C에서 배양하며 파골세포의 융합이 이루어지도록 하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 대조군과 양성대조군에 대해서도 동일한 조건으로 실험을 수행하였다. 양성대조군으로는 HS-1141과 CGS-25019C뿐만 아니라 DW1350 및 DW1352와 유사 화학구조를 가지고 있는 4-[4-(4-(5-이소프토펴-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시)부록시]-펜츠아미딘(이하 DW1351이라 한다) 및 N-하이드록시-4-[4-(4-(5-이소프토펴-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시)부록시]-펜츠아미딘(이하 DW1349라 한다) 등도 사용하였다.

3. 파골세포의 융합정도의 측정 및 분석

세포를 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 1회 세척하여 10% 포르말린을 포함한 PBS용액에 세포를 약 5분간 고정하였다. 에탄올/아세톤(1/1)에 약 5분간 재차 고정한 후 건조하였다. TRAP 염색액을 15분간 처리 후 수세 건조하여 현미경하에서 관찰하였다. 융합에 의해 단핵세포에서 다핵세포(10개 이상의 핵을 가진 파골세포)로 분화된 TRAP 양성파골세포수를 측정하였다. 결과는 측정된 세포수를 대조군과 비교하여 보인 차이율 % 억제농도로 하여 표 2로 나타내었다.

[표 2]

시 료	억제 정도(%)					IC ₅₀
	0.08uM	0.4uM	2uM	10uM		
DW1350	4.50	25.64	80.00	97.95		0.81uM
DW1352	5.13	24.72	87.18	98.97		0.74uM
HS-1141	2.1	12.31	15.71	36.29	-	
CGS-25019C	10.14	13.04	13.77	12.32	-	
DW1351	0.0	0.0	38	74		
DW1349	0.0	2.3	4.5	18	-	

상기 표 2의 결과에서 보듯이 DW1350과 DW1352는 파골세포의 융합과정에 탁월한 저해효과(IC₅₀: 각각 0.81과 0.74uM)를 보였다. 즉, DW1350과 DW1352의 융합억제효과로 인하여 융합에 의해 형성되는 성숙파골세포가 만들

어지는 과정이 저해를 받아 파골세포의 골 흡수 기능이 탁월하게 억제된다. 대조약물로 쓰인 공지의 CGS-25019C는 약물농도에 상관없이 파골세포의 융합저해효과가 거의 보이지 않았고, HS-1141은 약물농도의 의존성이 보이나, DW1350과 DW1352보다 낮은 억제능력을 보여주었다. 특히 DW1350 및 DW1352와 화학구조적으로 극히 유사한 DW1349 및 DW1351도 역시 HS-1141과 같이 약물농도의 의존성이 보이나, DW1350 및 DW1352보다 현저히 낮은 억제능력을 보였다.

따라서 4-[(4-티아졸릴)페녹시]알콕시-벤즈아미딘 유도체 중에서도 DW1350과 DW1352는 융합과정의 저해를 통해 성숙한 파골세포로의 형성을 효과적으로 차단시킴으로써 새로운 골다공증 치료제로 개발될 수 있을 것이다.

[실시 예 3] 골 흡수능의 측정(pit formation assay)

성숙한 파골세포(OCN)의 주 기능은 뼈의 흡수를 통해 뼈를 분해시키는 활성을 가진다. 본 실험은 상아절편 상에서 파골세포의 골 흡수 능력을 저해하는 각 실험물질들의 억제효과를 알아보는 평가법이다. (Eijiro Jimi et al. Endocrinology 137, p2187-2190, 1996)

1. 성숙한 파골세포의 준비

가. 콜라겐 젤 용액의 조제

콜라겐 겔(cell matrix Type I-A) 배양접시를 이용하여 공존배양을 수행하였다. 이들의 조성은 콜라겐, 5배 농축된 α -MEM 배지, 0.05M NaOH 완충액(2.2% NaHCO₃, pH7.4)을 각각 7:2:1의 비율로 저온에서 혼합하여 저온보관하고, 100mm 배양접시에 4mL의 용액을 첨가 후 고무 도포하고 37°C에서 5분간 방치하였다.

나. 공존배양에 의한 성숙 파골세포의 준비

α -MEM 배지를 사용하여 상기 실시 예 1에서 분리한 골수세포와 골아세포를 각각 콜라겐 젤이 도포된 100mm 배양접시에 골아세포(약 5×10^5 cell/plate)와 골수세포(약 1×10^7 cells/plate)를 혼합하여 접종하였다. 비타민 D(10^{-9} M)과 테트라산(10^{-6} M)과 같은 분화인자의 존재 하에서 공존배양 하였다. 골 흡수 활성을 가진 다핵의 성숙한 파골세포는 위에서 서술한 방법처럼 7일간의 공존배양을 통해 다핵의 파골세포를 확보하였다. 배양액을 제거한 후 0.2% 트라이카나아제를 20분간 처리하여 세포를 분리시킨 후에 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 crude 파골세포로서 다시 α -MEM 배지에 희석하여 5,000 cells/100ul가 되도록 세포를 준비하였다.

2. 헤마톡실린(hematoxylin) 염색액의 제조

헤마톡실린 1g을 정제수 500ml에 녹인 후 정제수 500ml과 요오드산나트륨 0.2g을 가하고 15분간 교반하였다. 암모니움 50g과 아세트산(농도상) 7.5ml를 가하고 충분히 교반한 후 여과하여 염색액으로 사용하였다.

3. 상아절편상에서의 반응

1mm 두께로 절단된 상아절편을 멸균하여 96 well plate에 하나씩 넣고, α -MEM 배지(10% FBS) 100ul를 첨가하였다. 파골세포의 pit 형성 저해활성을 측정하기 위해 실험 물질들은 농도별로 최소 3ul의 양으로 넣었다. 시료첨가 후 준비된 파골세포용액을 100ul 넣고, 잘 혼합하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 24시간 배양하였다. 상아절편에 형성된 pit의 관찰하기 위하여 파골세포가 성장한 부분을 위로 향하게 하여 96 well plate로부터 꺼내 종이타월에 올려놓고 상아 위 세포를 제거한 후, 헤마톡신용액 10ul를 상아 위에 떨어뜨려 약 5분 정도 염색을 실시하였다. 염색액을 제거하고 상아절편 표면을 부드러운 면봉으로 문질러 염색액을 완전히 제거하였다.

4. 생성된 pit의 관찰과 분석

현미경상으로 상아절편에 생성된 pit의 수를 측정하여 대조군과 비교하여 보인 차이를 % 억제 활성정도로 나타내었다.

[표 3]

시 료	억제 정도(%)					IC ₅₀
	0.016uM	0.08uM	0.4uM	2uM	10uM	
DW1350	32.2	53.9	65.2	84.3	91.3	0.075uM
DW1352	25.0	48.7	61.3	81.7	90.0	0.131uM
HS-1141	9	33	50.4	75.3	88.7	0.421uM
CGS-25019C	0	0	2	9.2	17.3	-

상기 표 3에 나타난 바와 같이 DW1350과 DW1352는 파골세포의 주 기능인 골 흡수기능에 대해 탁월한 억제 능력을 보여 주고 있다. DW1350은 0.075uM, DW1352는 0.131uM의 IC₅₀ 값을 가져 HS-1141보다 3~6배 정도의 더 우수한 골흡수 억제능력을 지니고 있음을 상기 실험을 통해 관찰되었다. 그러나 양성대조군인 CGS-25019C는 본 실험에 대해 아무런 골 흡수 저해기능을 갖고 있음을 알 수 있었다.

[실시 예 4] 조골세포 활성 측정을 위한 ALP 활성 평가

조골세포의 뼈의 형성과 밀접한 관계를 갖고 있는 ALP(Alkaline Phosphatase)의 활성을 측정하여 조골세포의 분화 및 활성의 정도를 평가하는 실험이다(Y. Wada et al., Bone, 22, 479-485, 1998).

조골세포에서 유래된 MC3T3-E1 세포를 well당 3,000 cells씩 96 well plate에 배양하여 24시간이 경과한 후에 분화인자인 아스코르브산(100ug/ml)과 5mM β -글리세로인산이 첨가된 새로운 배지로 교환하였다. 이때, 실험약물을 같이 처리하였으며, 새로운 배지로의 교환은 매 3일 마다 반복한다. 2주 후에 ALP의 활성을 측정하고자 배양을 중지

하고, 상등액을 제거한다. 0.5% Triton X-100을 첨가하여 세포를 용해시킨 후, 50ul을 꺼내 여기에 p-니트로페닐포스페이트(1.21mM)를 100ul 첨가한다. 37℃에서 30분간 반응시키고, 0.2N 수산화나트륨을 50ul 첨가하여 반응을 정지시킨다. 표준물질로 p-니트로페놀을 사용하여 405nm의 흡광도에서 표준곡선을 그린 후, 반응한 실험물질의 흡광도를 측정하여 생성된 p-니트로페놀의 양을 측정하였다.

ALP 활성의 단위표시는 각 실험물질의 단백질량을 측정한 후 시간(분 당 혹은 시간 당)당 1ug의 단백질 당 생성하는 p-니트로페놀(nM)의 양으로 결정하였고 그 결과를 아래 표 4에 나타내었다.

[표 4]

시료 (10 ⁻⁸ M)	ALP 활성 (Units)
DW1350	19.8
DW1352	17.1
HS-1141	15.2
CGS-25019C	15.0
대조군	13.5

상기 결과와 같이 DW1350은 대조군을 포함한 모든 실험군에 비해 가장 높은 수치의 ALP 활성을 보였다. DW1352도 대조군 및 HS-1141과 CGS-25019C에 비해 월등한 실험 결과를 나타내었다. 본 실험을 통해 DW1350 및 DW1352는 조골세포의 분화 및 형성에 밀접한 영향을 끼쳐 조골세포의 활성을 증가시키는 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 이에 DW1350과 DW1352는 파골세포의 억제능력 뿐만 아니라 조골세포의 활성능력을 갖춘 골다공증 예방 및 치료제로서의 역할을 수행하는데 여러 가지 장점을 지니고 있다.

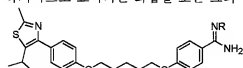
발명의 효과

상기한 실시 예의 결과로부터, LTB-4 수용체의 길항제로 작용하는 본 발명의 DW1350과 DW1352는 파골세포의 분화, 형성, 융합과정 및 골 흡수 기능에서 우수한 저해효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 같은 용도의 약물로 개발된 HS-1141과 CGS-25019C뿐만 아니라 구조적 유사성이 있는 DW1349 및 DW1351보다도 파골세포에서의 억제기능이 현저히 뛰어나고 또한 조골세포의 활성을 증가시키는 효능을 가지고 있으므로 골다공증 예방 및 치료제의 용도로 적합한 물질임이 판명되었다. 따라서 본 발명의 화합물은 LTB-4와 관련된 각종 질병뿐만 아니라 특히 효과적인 파골세포 억제능력과 동시에 조골세포 활성능력을 갖추어서 새로운 작용기전을 가진 우수한 골다공증의 예방 및 치료효과를 기대 할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기식으로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 유효한 양으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료제



상기 식에서 R은 H 또는 OH이다.

청구항 2.

제 1항에 있어서, N-히드록시-4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 그의 염을 유효한 양으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료제

청구항 3.

제 1항에 있어서, 4-{5-[4-(5-이소프로필-2-메틸-1,3-티아졸-4-일)페녹시]펜톡시}-벤즈아미딘 또는 그의 염을 유효한 양으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제